

SVEU ILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATI KI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

CJEPIVA PROTIV TUMORSKIH STANICA

CANCER VACCINES

SEMINARSKI RAD

Adrijana Perkovi

Preddiplomski studij molekularne biologe

(Undergraduate Study of molecular biology)

Mentor: doc. dr. sc. Inga Marijanovi

Zagreb, 2012.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	2
2. BIOLOGIJA TUMORA.....	3
2.1.KLASIFIKACIJA TUMORA.....	3
2.2. KARAKTERISTIKE TUMORA.....	4
2.3. NASTANAK TUMORA.....	6
3. IMUNOSUPRESIVNI OKOLIŠ TUMORA.....	8
4. IMUNOLOŠKI ODGOVOR NA TUMORE.....	9
5. CJEPIVA U RAZVOJU.....	11
5.1. TERAPEUTSKA CJEPIVA.....	16
5.1.1. TIPOVI TERAPEUTSKIH CJEPIVA.....	16
5.1.1.1. CJEPIVA SASTAVLJENA OD CIJELIH TUMORSKIH STANICA.....	16
5.1.1.2. „HEAT-SHOCK“ PROTEINI.....	17
5.1.1.3 CJEPIVA NA BAZI PEPTIDA.....	17
5.1.1.4. CJEPIVA NA BAZI DENDRITI NIH STANICA.....	18
5.2. CJEPIVA ZA PREVENCIJU TUMORA.....	20
5. ZAKLJUČAK.....	21
6. LITERATURA.....	22

1. UVOD

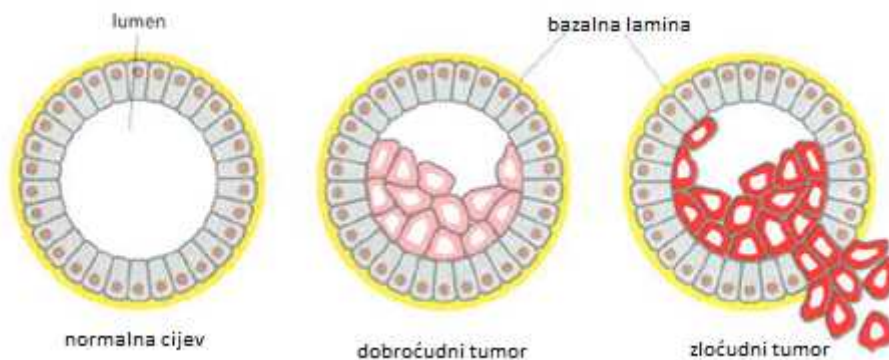
Zanimanje ljudi za tumore datira još iz najranijih vremena. Prvi zapis koji ukazuje na postojanje tumora datira još iz 3000. godine PNE. U staroj Grčkoj Hipokrat također spominje tumore opisujući ih kao grčkom riječju *carcinos* (rak). Iz tog doba postoje samo površinske slike raka, pošto se otvaranje tijela protivilo grčkoj tradiciji. Tek je u 16. i 17. stoljeću za doktore postalo prihvatljivo secirati ljudska tijela da bi se utvrdio uzrok smrti. Veliki pomak u istraživanju tumora zasigurno je bio uzrokovan otkrićem mikroskopa u 18. stoljeću. Prvi pokušaji kirurškog odstranjenja tumora bila su u većini slučajeva bezuspješni i redovito su završavala smrću zbog loših higijenskih uvjeta. Uvođenjem asepsi tih uvjeta stopa smrtnosti je izrazito pala. Polje onkologije se polako progresivno razvijati i razvija se još i danas.

Istraživanje tumora izrazito je bitno zato što se procjenjuje da je 1/5 svih smrti uzrokovana upravo tumorom¹. Zbog toga, a i zbog toga što je tumor izrazito zanimljiv i kompleksan sustav, mnoga znanstvena istraživanja danas fokusiraju se na tumore. Prvo se nastojalo klasificirati tumore te istražiti njihovu biologiju te otkriti po čemu su to tumori karakteristični. Naravno, jako velik interes je pridodan liječenju tumora. Prvi pokušaji liječenja, kao što je navedeno, bili su kirurški. Kirurško odstranjenje tumora usavršeno je i efikasno je kada se radi o dobro udnim tumorima koji su na pristupačnim mjestima, ali ne i kada su u pitanju zloćudni tumori. Da bi se riješio taj problem, znanstvenici su nastojali pronaći alternativu kirurgiji za liječenje tumora. Prešlo se na kemoterapiju, koja je u mnogim slučajevima efikasna, ali je i izrazito agresivna metoda koja ne ubija samo stanice tumora nego i stanice domaćina.

U novije vrijeme pojavila se ideja o razvoju cjepiva protiv tumorskih stanica. Ideja cjepiva je da se ciljano uništavaju tumorske stanice uz minimalnu štetu domaćina i uz minimalne nuspojave. To je dio znanosti koji se razvija velikom brzinom, a daje nam mnogobrojne nove mogućnosti. Pri razvoju cjepiva jako važnu ulogu igra naš imunološki sustav, interakcija tumora s našim imunološkim sustavom te antigeni tumora, tj. kako organizam prepoznaje sam tumor. Prije dizajniranja cjepiva veoma je važno dobro poznavati biologiju samog tumora kako bi se razvio što efikasniji put za suzbijanje tumora.

2. BIOLOGIJA TUMORA

Pojmovi tumor i rak često se koriste kao sinonimi, što može u mnogim slučajevima dovesti do krivih zaključaka. Tumor je izraz za svaku nenormalnu proliferaciju stanica u tijelu koja može biti dobroćudna ili zloćudna.



Slika 1: Razlika između benignog i malignog tumora (preuzeto iz: Alberts, 2008¹)

Dobroćudni tumor ostaje ograničen na mjesto na kojem je nastao, ne širi se u susjedna normalna tkiva niti u udaljene dijelove tijela. Zloćudni tumor, odnosno rak je skupina bolesti koje karakterizira neregulirani stanični rast. On je u stanju proširiti se na susjedna normalna tkiva i cijelo tijelo preko krvožilnog ili limfatičkog sustava tvoreći metastaze².

2.1. KLASIFIKACIJA TUMORA

Klasifikacija tumora vrši se prema vrsti stanica iz kojih nastaju. Većina ih se može svrstati u jednu od tri glavne skupine: karcinome, sarkome i leukemije ili limfome.² Otprilike 85% svih tumora kod ljudi pojavljuju se u epitelnim stanicama, te njih svrstavamo u karcinome³. Sarkomi, rijetki u ljudi, solidni su tumori vezivnih tkiva poput mišića, kosti, hrskavica i veziva u užem smislu. Leukemije i limfomi, na koje otpada oko 7% zloćudnih bolesti u ljudi, nastaju iz krvotvornih stanica i iz stanica imunostava. Daljnja klasifikacija temelji se prema tkivu iz kojeg nastaju i vrsti zahvaćenih stanica².

2.2. KARAKTERISTIKE TUMORA

Tumori različitog postanka imaju i različita obilježja. Finim analizama, Hallmarks i Weinberg definirali su šest obilježja koje imaju, ako ne i svih stanica raka.

1. Neovisnost o signalima za rast

- normalnim stanicama su za dijeljenje potrebni vanjski signali koji potječu od faktora rasta
- stanice raka nisu ovisne o normalnim faktorima rasta
- mutacije u putevima faktora rasta dovode do nereguliranog rasta

2. Tolerantnost na inhibitore rasta

- normalne stanice odgovaraju na inhibitorne signale da bi održale homeostazu (svaka stanica u tijelu ne dijeli se aktivno)
- stanice raka ne reagiraju na inhibitorne signale
- određene mutacije interferiraju sa inhibitornim putevima

3. Izbjegavanje apoptoze

- normalne stanice uklanjaju se apoptozom (programirana stanična smrt), često zbog oštećenja DNA molekule
- stanice raka ne reagiraju na signale koji induciraju apoptozu

4. Neograničena množenja

- normalne stanice imaju određeni broj dioba, nakon kojeg se stanice prestaju dijeliti, te nastupa starenje i konačna smrt stanice. Trenutak prestanka dijeljenja određuje se krajevima

kromosoma, tj. dužinom tih krajeva; telomerama. Skraćivanje telomera događa se tijekom svakog replikacijskog ciklusa.

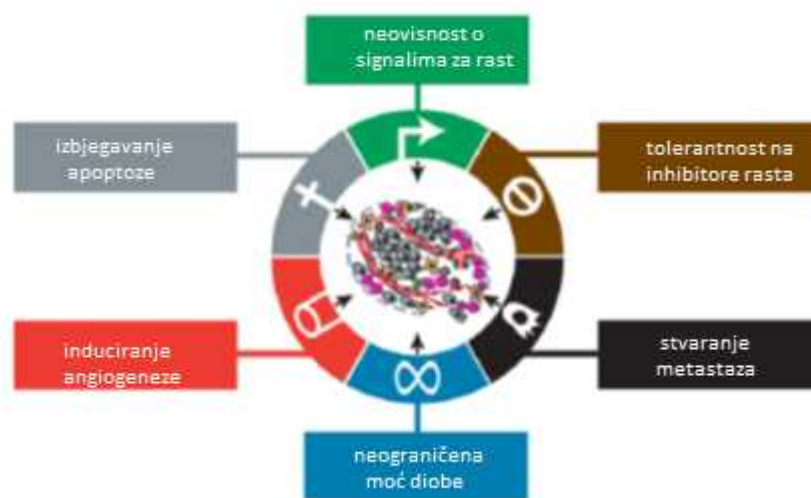
- stanice raka zadržavaju konstantnu dužinu telomera -> to uzrokuje neograničen broj dioba

5. Angiogeneza (formacija novih krvnih žila)

- kisik i nutrijenti do normalnih stanica dolaze krvnim žilama, „arhitektura“ vaskularne mreže je više manje konstantna u odrasloj osobi.
- stanice raka induciraju angiogenezu; rast novih krvnih žila što je potrebno za preživljavanje i ekspanziju tumora
- mijenjaju i ravnotežu između induktora i inhibitora angiogeneze može dovesti do aktivacije iste.

6. Stvaranje metastaza

- normalne stanice zadržavaju svoju poziciju u organizmu; ne migriraju
- jedan od glavnih uzroka smrti uzrokovane rakom leži upravo u migracijama stanica raka u druge dijelove organizma
- mutacije dovode do promjene aktivnosti enzima koji su uključeni u invaziju i mijenjaju molekule koje su zadužene za adheziju između stanica i stanica i ekstracelularnog matriksa³.

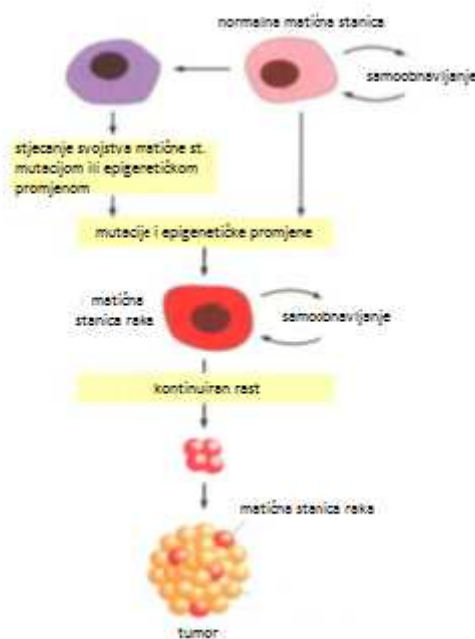


Slika 2: Šest obilježja tumora (preuzeto iz: Hanahan, 2000⁴)

2.3. NASTANAK TUMORA

Primarni tumor najčešće nastaje od jedne jedine stanice. Vjeruje se da primarni tumor nastaje diobom stanice koja u sebi nosi neke nasljedne promjene¹. Induciranjem tumora različitim agensima (karcinogeni) došlo se do zaključka da tumor nastaje zbog alternacija i/ili mutacija u molekuli DNA³. Da bi jedna stanica mogla biti ishodište tumora, ona mora mutacije prenijeti na svoje stanice kćeri, tj. mutacije u DNA molekuli moraju biti nasljedne. Važno je pritom napomenuti da do nasljedne aberacije može doći i zbog promjene u samom genetičkom kodu, ali razlog nasljedne aberacije može biti i epigenetički; što podrazumijeva trajne promjene u uzorku genske ekspresije bez promjene u DNA slijedu¹. Jedna jedina mutacija u molekuli DNA nije dostatna za stvaranje tumorske stanice te mnoge studije pokazuju da je za nastanak tumorske stanice potreban set rijetkih genetičkih mutacija u jednoj stanici⁴. Mutacije se u ljudskim tumorskim stanicama akumuliraju jako velikom brzinom. Ta genetička nestabilnost može rezultirati nemogućnošću u popravku DNA molekule¹. Mutacije koje dovode do tvorbe tumorskih stanica mogu se događati u somatskim stanicama i u germinativnim stanicama. Mutacije koje su

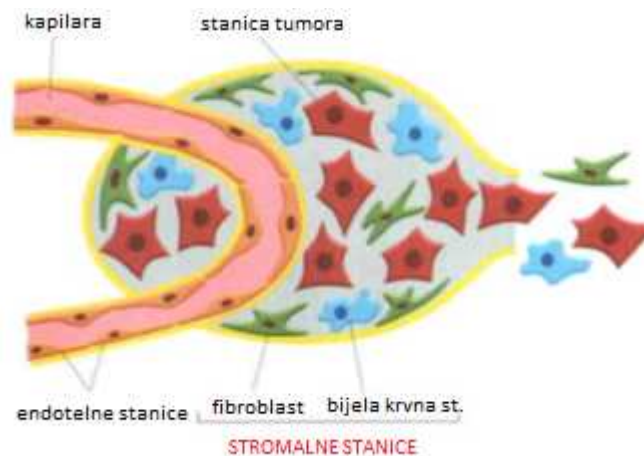
se dogodile u somatskim stanicama ne prosljeđuju se na potomstvo, nego zahvaćaju samo taj određeni organizam, a prenose se na stanice kćeri nakon stanične diobe. Na potomstvo se prenose samo alternacije koje su se dogodile u DNA molekulama jajne ili spermatne stanice. Rijetko se događa da takve mutacije dovode neposredno do nastanka raka, ali često se događa da takve mutacije povećavaju rizik od dobivanja istog³. Jedna od važnih odlika tumora je da se za vrijeme svoje progresije cijelo vrijeme mijenjaju i adaptiraju na okoliš u kojem se nalaze. Pošto stanice tumora izrazito brzo mutiraju, dolazi do nakupljanja genetičkih mutacija koje su onda dobra podloga za selekciju. Zaživjet će one mutacije koje tumorskoj stanici daju prednost nad okolnim stanicama. Tu mnogi znanstvenici vuku analogiju sa Darwinovim konceptom evolucije i to je jedna od teorija nastanka tumora. Druga teorija koja govori o evoluciji tumorskih stanica je teorija matičnih stanica. Dva važna svojstva matičnih stanica je da se mogu samoobnavljati i da mogu diobom dati stanice kćeri koje se mogu diferencirati u različite tipove stanica. Diobom matične stanice nastaju dvije stanice; matična stanica i diferencirana stanica kćer. Mogućnost samoobnavljanja je svojstvo koje matične stanice dijele sa stanicama tumora.



Slika 3: Proces nastanka raka iz matičnih stanica (preuzeto iz: Alberts, 2008¹)

3. IMUNOSUPRESIVNI OKOLIŠ TUMORA

Mnogo godina studije koju su se bavile istraživanjem raka fokusirale su se na samu stanicu (tj. stanice raka). Posljednjih godina fokus sa same stanice raka premješta se sa stanice raka na okoliš u kojem se stanice raka nalaze, tj. na njezin mikrookoliš. Normalni mikrookoliš stanice inhibira rast malignih tvorbi, no rastom tumora dolazi do promjena u samom mikrookolišu stanice koje dovode do toga da mikrookoliš tumora sinergisti ki djeluje na proliferaciju tumora⁴. U mikrookoliš stanice raka spadaju normalne stanice i molekule koje okružuju stanice raka. Osnovni tipovi stanica koje nalazimo u mikrookolišu tumorske stanice su epitelne stanice (normalne epitelne stanice, tj. epitelne stanice koje se još nisu transformirale u tumorske), fibroblasti i stanice koje grade krvne žile, stanice ekstracelularnog matriksa, te imunosne stanice. Tako er, u mikrookolišu nalazimo mnoge molekule. Neke od tih molekula spadaju u specijalnu vrstu faktora rasta; kemokini i citokini. Citokini i kemokini su kemijski i celularni aktivatori. Pored citokina i kemokina tu je mnoštvo molekula (npr. kisik) koji imaju sposobnost promijeniti pH okolnog tkiva⁵.



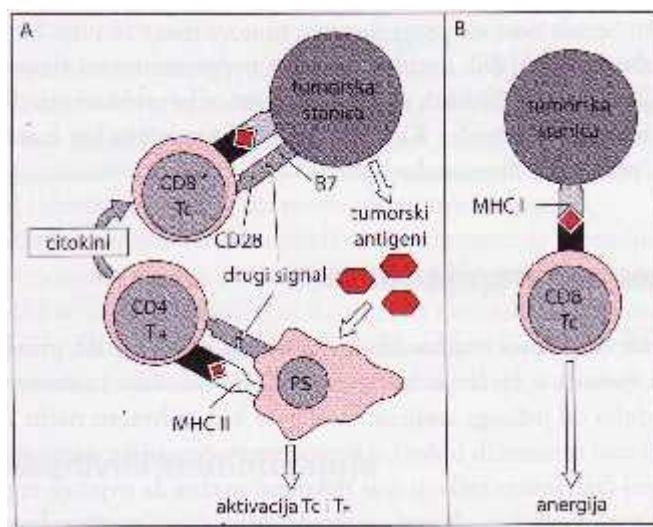
Slika 4: Uloga mikrookoliša u tumorskom rastu (preuzeto iz: Alberts, 2008¹)

Progresija tumorskog tkiva upravo je potaknuta komunikacijom između u tumorskih stanica i stanica mikrookoliša⁶. Stromalne i ostale „normalne“ stanice stvaraju povoljan mikrookoliš za rast tumora, angiogenezu i metastaziranje. Stanice strome igraju najvažniju ulogu; izlukuju tumor-poticanje i tumor supresijske signale. Metabolizam tumora izravno je pogođen nedostatkom krvnih žila što ujedno i znači nedovoljna opskrba kisikom. Nedostatak kisika u tumorskom tkivu dovodi do hipoksije koja rezultira u acidozi (zbog nakupljanja mliječne kiseline koja nastaje kao nusprodukt anaerobne glikolize). Upravo taj acidozni mikrookoliš izrazito smanjuje efikasnost alkalinih kemoterapijskih lijekova. Hipoksični uvjeti dovode do nestabilnosti u genomu što također promovira rast i preživljavanje tumora, te biranje fenotipski agresivnijih stanica.

Interakcije među stanicama raka i imunosnim stanicama dodatno dovode do stvaranja imunosupresivnog okoliša koji dovodi do proliferacije tumora, štiti tumor od mehanizama imunosne obrane i slabi efikasnost imunoterapijskih pristupa. Često dolazi do stvaranja tolerantnosti na tumorsko tkivo, posebno kod tumora koji su uznapredovali. Tumori na različite načine mogu suprimirati imunosni sustav putem lučenjem citokina, mijenjanjem antigen prezentirajućih stanica te kostimulatornih i koinhibitornih molekula⁷.

4. IMUNOLOŠKI ODGOVOR NA TUMORE

Upravo su citotoksični limfociti T glavni efektori anti-tumorskog odgovora. Imaju sposobnost izravnim dodiranjem uništiti tumorsku stanicu. Limfociti T nikad ne prepoznaju tuđi antigen (tumorski u ovom slučaju) izolirano nego samo spregnuto, u kompleksu s molekulama MHC-I vlastitog organizma. Nažalost, brojni tumori slabo izražavaju MHC-I pa to ograničava ulogu citotoksičnih limfocita i omogućuje tumoru da ne zamijeti izmakne imunosnom nadzoru. Prepoznavanje se vrši pomoću receptora limfocita T (TCR receptor). Za aktivaciju limfocita T potrebna su dva signala, prvi (specifični) signal – dodir receptora limfocita T s kompleksom dvaju molekula (MHC+prerađeni tuđi peptid) na predonoj stanici te drugi kostimulacijski signal. Stanice koje predonoju antigen (antigen prezentirajuće stanice) imaju zadatak da na svojoj membrani izlože antigen i time omogućuju njihovo prepoznavanje pomoću limfocita T. Tri su glavne skupine profesionalnih predonojih stanica; dendritne stanice, makrofagi i limfociti B. Predonojne stanice imunosnog sustava imaju ulogu da prerade antigen, a tek onda njegove dijelove, koje nazivamo antigenskim determinantama, izlože na svojoj membrani, gdje ih prepoznaju limfociti T. Jedne od glavnih predonojih stanica u imunosnom odgovoru na tumor su dendritne stanice³. Dendritne stanice nalaze se primarno u koži. Dijelimo ih na: Langerhansove stanice, intersticijske dendritne stanice, dendritne stanice monocitnog podrijetla, plazmocitoidne dendritne stanice i konvencionalne dendritne stanice². Endocitoza je primarni način uzimanja antigena od strane dendritnih stanica. Prerađeni antigen se izloži na membrani zajedno u kompleksu s molekulama MHC koje se također nalaze na membrani predonojne stanice. Važnost MHC molekula je u tome što organizam prepoznaje antigen jedino ako je on predonojen u sklopu vlastitih MHC molekula. MHC molekule dijele se u dvije podskupine, MHC I i MHC II. Također, predonojne stanice pružaju i kostimulacijski signal nužan za aktivaciju limfocita T. Upravo bi nedostatak kostimulatora ili molekula MHC-II koji su potrebni za aktivaciju limfocita T mogao biti još jedan od uzroka izbjegavanja imunoreakcije. Drugi dodatni signal daje interakcija CD80 (B7) na predonoj stanici i molekule CD28 na limfocitu T. Oba su signala potrebna da potaknu proizvodnju IL-2 i proliferaciju limfocita T. Uslijed nedostataka drugog signala dolazi do anergije citotoksičnih limfocita T².

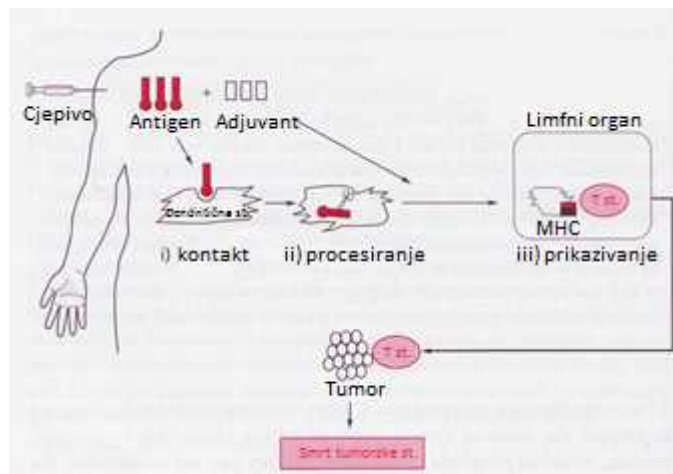


Slika 5: Predo avanje tumorskih antigena limfocitima. (preuzeto iz: Andreis, 2010²)

Dobro poznavanje imunološkog odgovora na tumorske antigene važan je u efektivnoj borbi protiv tumora. Tek kada se dobio uvid u tu složenu imunosnu reakciju moglo se krenuti u dizajniranje cjepiva kako bi se suzbile tumorske stanice. Pri tome se velika važnost treba posvetiti MHC molekulama, antigenima te kostimulacijskim molekulama. Upravo su se kostimulacijske molekule pokazale jako važnima u induciranju odgovora protiv tumora prilikom upotrebe cjepiva.

5. CJEPIVA U RAZVOJU

Ideja o cjepivima protiv tumorskih stanica pojavila se upravo tijekom prou avanja imunosnog odgovora na tumore⁸. Kroz ljudsku povijest imamo primjere raznih bolesti koje su esto bile uzrok masovnih izumiranja, te su primjenom cjepiva skoro pa potpuno eliminirane. Primije eno je da naš imunološki sustav primje uje i uništava tumorske stanice. U biti, tumorske stanice u našem tijelu nastaju na svakodnevnoj bazi. Upravo je imunološki sustav taj koji detektira promijenjene stanice te ih lizira. Tek kada naš imunološki sustav „zakaže“ može do i do nastanka tumora. Novije studije su pokazale da efektorne stanice imunološkog sustava mogu prepoznati antigene tumorskih stanice te ih potom eliminirati. Upravo to svojstvo imunološkog sustava ukazuje na to da je senzibilizacija na tumorske stanice pomo u vakcina mogu a.⁹

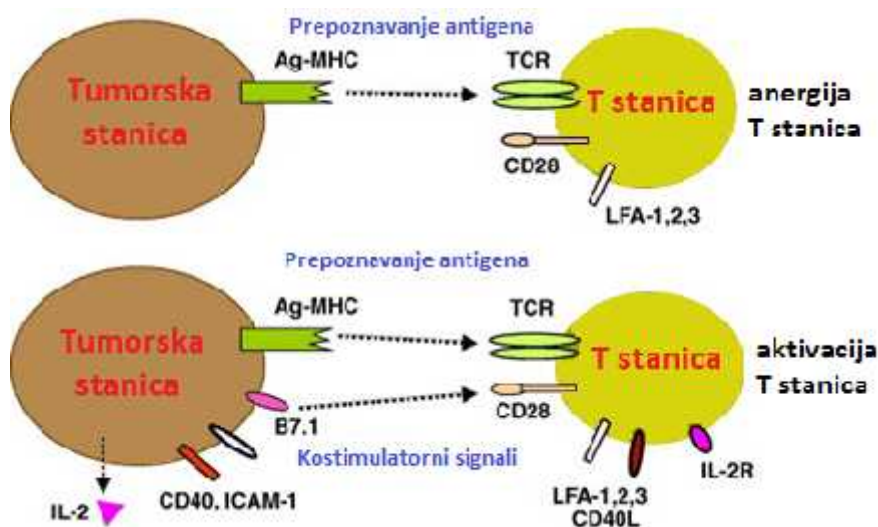


Slika 6: Događaji u stanici nakon vakcinacije (preuzeto iz: Pecorino, 2008³)

Prilikom dizajniranja cjepiva protiv tumorskih stanica posebno je važno obratiti pažnju na to koji antigen i koji adjuvant koristiti, koji tip imunskog odgovora izazivamo i kako da ga učinimo dugotrajnim.

Prvi korak u proizvodnji cjepiva je odabir pogodnog antigena koji će uspješno stimulirati efektivni anti-tumorski odgovor⁸. Antigeni se dobivaju degradacijom odmotanih intracelularnih proteina koji su prebačeni do površine tumorske stanice. Također, antigene možemo dobiti i od oštećenih ili umirućih tumorskih stanica. Prvi tipovi tumorskih cjepiva bila su sastavljena od oštećenih tumorskih stanica. Ovaj tip cjepiva napravljen je po uzoru na cjepiva protiv virusa i bakterija i virusa koja su se u ovom obliku pokazala vrlo uspješnim. Pošto su u cjepivu prisutne cijele stanice, samo znatno oslabljene, logičan zaključak je da cjepivo sadrži sve antigene koje nalazimo na određenoj tumorskoj stanici. Kao što je već prije navedeno, glavne izvršne stanice koje prepoznaju tumorske antigene i onda aktiviraju izvršne mehanizme imunološkog sustava su limfociti T. Antigeni koji se nalaze u vakcini moraju se na neki način predložiti limfocitima T. To se postiže vezanjem antigena na površinu predložne stanice³.

Za efektivnu aktivaciju T-limfocita potrebna su dva signala. Prvi preko TCR receptora, te drugi kostimulatorni. To je dovelo do upotrebe cjepiva koja su bila sastavljena od stanica tumora koje su prethodno genetički modificirane kako bi se povećala ekspresija raznih kostimulatornih molekula i/ili citokina. Iako su ovakva cjepiva dala zadovoljavajuće rezultate kod primjene na mišjim modelima u daljnjim kliničkim istraživanjima su zakazala⁸. Imunosni odgovor koji se dobije ovakvim cijepljenjem je vrlo slab, a često je ovakvim cijepljenjem došlo i do razvoja autoimunosti³. Razvoj autoimunosti nije samo hipotetski; do pojave autoimunosti došlo je tijekom ispitivanja kako na animalnim modelima tako i prilikom kliničkih istraživanja. Usprkos svemu, upotreba cijelih tumorskih stanica ima jednu jako veliku prednost u odnosu na ostale oblike terapije a to je specifičnost⁸.



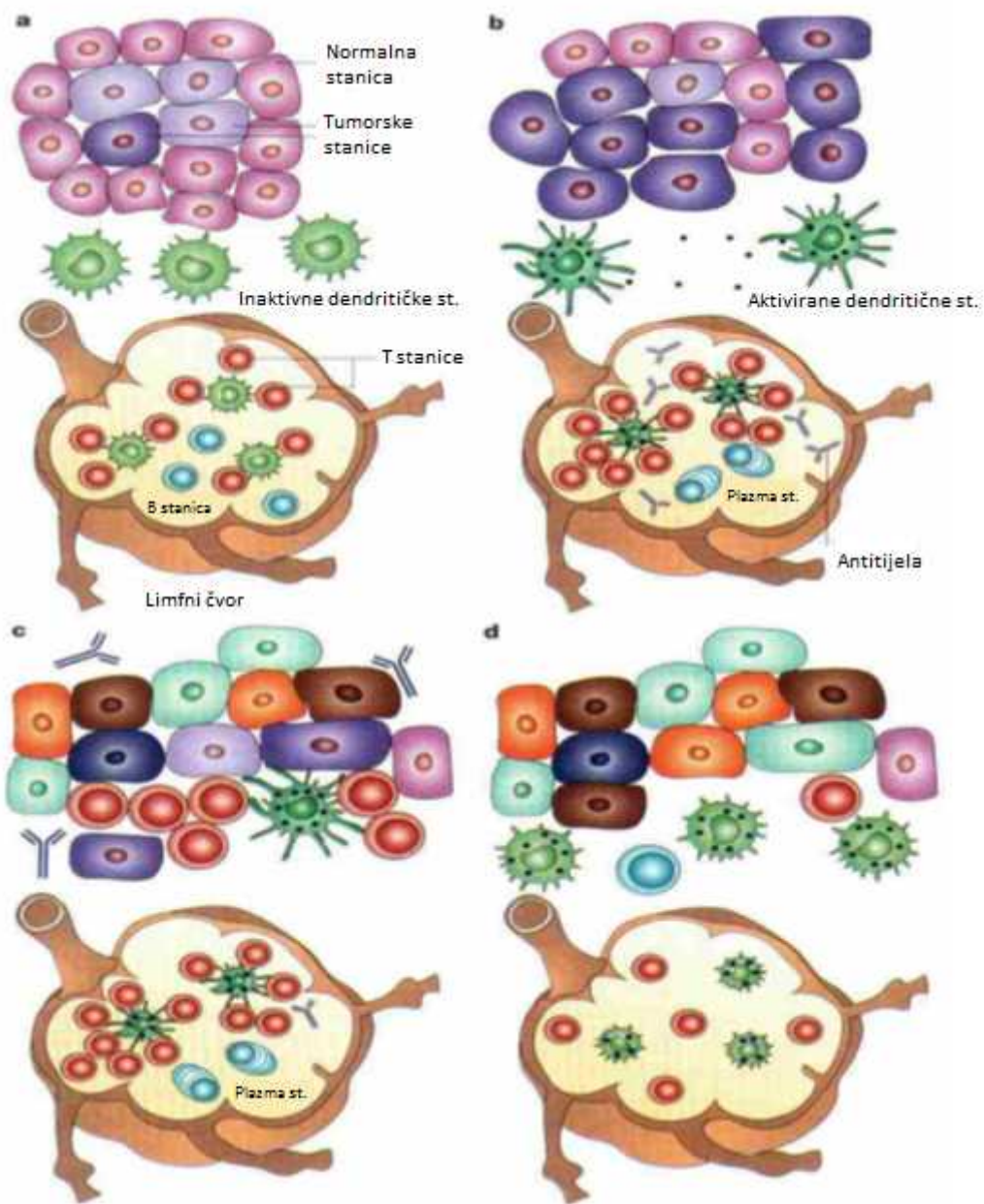
Slika 7: Prepoznavanje tumorske stanice (preuzeto iz: Joseph, 2002¹⁰)

Prilikom dizajniranja cjepiva mora se odabrati pravi adjuvant. Adjuvanti su ključne komponente svih anti-tumorskih cjepiva, neovisno o kojem tipu cjepiva se radi¹¹. Adjuvanti mogu aktivirati antigen predodane stanice. Tako aktivirane predodane stanice u inkubaciji stimuliraju T-limfocite, aktiviraju NK stanice, te potiču na izlučivanje citokina i omogućavaju preživljavanje antigen-specifičnih T-limfocita. Dugo vremena su se kao adjuvanti koristili citokini (kao npr. IL-2), GM-CSF, IL-12, IL-14 i mnogi drugi. Kao adjuvant se dugo koristio i lipopolisaharid (LPS) iz gram-negativnih bakterija. Iako su adjuvanti iznimno značajan sastojak anti-tumorskih cjepiva, na svjetskoj razini samo su dva adjuvanta odobrena za klinička istraživanja; aluminijske soli (alum) i MF59⁸.

Izrazito je bitno i paziti na to koji tip imunološkog odgovora se izaziva. Kod tumora koji metastaziraju potrebno je izazvati sistematsku imunost i većina razvijenih cjepiva do sada bila je usmjerena na izazivanje sistematske imunosti¹¹. Tijekom godina istraživanja primijećeno je da mnogi tumori (primarni tumori) imaju izvoriste na mukoznim stanicama i membranama te prvi kontakt ostvaruju s mukoznim imunim sustavom. Sve se više radi na proizvodnji cjepiva koja bi potaknula kako sistematsku tako i mukoznu imunost. Zadaća mukoznog imunološkog sustava je brza eliminacija patogena, a da pritom ne reagira na antigene iz hrane i na normalnu bakterijsku floru. Prilikom upotrebe cjepiva koje utječu na mukozne stanice potrebno je paziti da se ne poremeti ta fina ravnoteža a istovremeno je potrebno pojačati imunski odgovor protiv patogena¹².

Također, jedan od važnih mehanizama obrane protiv tumorskih stanica kojemu se u posljednje vrijeme posvećuje sve više pažnje je imunološka memorija koje neka cjepiva potiču a neka ne. Ovo je relativno novo područje istraživanja. Problem se javlja prilikom razdvajanja memorijskih T stanica od ostalih T stanica zbog malog broja specifičnih markera. Kemokinski receptori su se pokazali zasada najefektivnijima u razdvajanju T stanica na subpopulacije. Danas se zna da je za nastanak memorijskih stanica potrebna jaka primarna imunološka reakcija, no

znanstvenici još uvijek nisu sigurni što utječe na dugovječnost memorijskih stanica. Štoviše, nije jasno da li je uopće moguće stvaranje dugoročnog pamćenja za kronične bolesti kao što je tumor⁸.



Slika 8: Odgovor tumora na imunski sustav (preuzeto iz: Finn, 2003⁸)

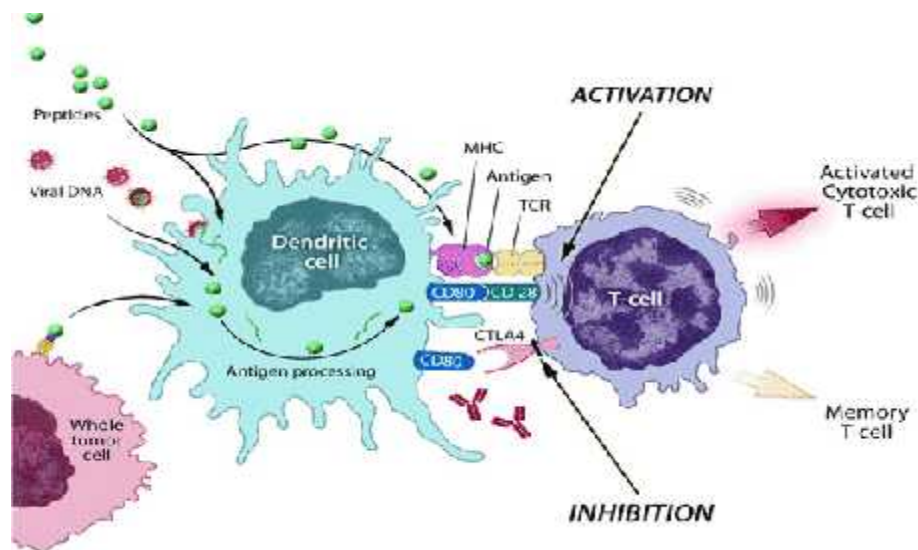
5.1. TERAPEUTSKA CJEPIVA

Terapeutska cjepiva predložena su kao terapija koja će potaknuti antitumorski imunitet u pacijentima te dovesti do prolongiranja ponovnog pojavljivanja bolesti¹³. Naime, mnogi primarni tumori se mogu odstraniti kirurški, te je i dosta dug period prije nego što se tumor opet pojavi na metastazirajućim mjestima. Klinička istraživanja s terapeutskim cjepivima protiv tumorskih stanica uglavnom se provode na osobama poodmakle dobi (65-80 godina) dok se gotova sva predklinička istraživanja izvode na mladim miševima. To može predstavljati problem jer mehanizam u T-limfocitima koji reagiraju na cjepivo može, ali i ne mora nužno biti odgovarajući njihov T-limfocita. Naime, timus već za vrijeme puberteta prestane razvijati naivne T-limfocite. Kod mišjih modela je jasno pokazano da je primarni imuni odgovor u mladim miševima puno jači nego u starim miševima. Vrlo malo predkliničkih studija koristi stare miševe, a oni koji koriste, pokazali su poteškoće kod induciranja efektivnog antitumorskog imunogenog odgovora kod starijih miševa. Upravo zbog toga sve se više posvećuje pažnja razvoju cjepiva koji bi riješili neke od tih problema⁸. U svrhu poboljšanja cjepiva dodaju se razne molekule koje djeluju kao kostimulatorne. Primijetilo se također da CpG-DNA izrazito potiče humoralnu i staničnu imunost¹¹.

5.1.1. TIPOVI TERAPEUTSKIH CJEPIVA

5.1.1.1. CJEPIVA SASTAVLJENA OD CIJELIH TUMORSKIH STANICA

Prvi tipovi tumorskih cjepiva. Sastavljena su od ožrađenih tumorskih stanica. Najveću primjenu našli su u liječenju melanoma. Terapeutska cjepiva protiv melanoma sastavljena su od lizata alogeničnih tumorskih linija u kombinaciji s adjuvantom⁸. Jedno od poznatih i odobrenih cjepiva je "Melacin". Pokazao je određene pozitivne efekte u kliničkim istraživanjima s pacijentima koji su imali poodmakli stadij melanoma. U 10-20% primijenjeno je smanjenje metastaziranja te u drugih 10-20% tumor je stabiliziran. Cjepivo je odobreno u Kanadi i SAD-u¹². "Canvaxin" je još jedno cjepivo razvijeno protiv melanoma koje spada u ovu skupinu te je testirano na pacijentima s poodmaklim stadijem melanoma. Rezultati kliničkog istraživanja pokazali su mali, ali statistički značajan postotak preživljenja tijekom primjene cjepiva¹¹.



Slika 9: Primjena cijelih tumorskih stanica u terapijske svrhe

preuzeto sa: www.cancer.gov

5.1.1.2. HEAT-SHOCK PROTEINI

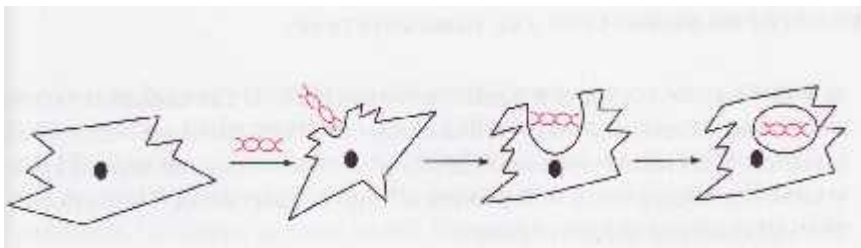
Primijećeno je da se za vakcinizaciju mogu upotrijebiti heat-shock proteini koji vežu tumorske antigene. Oni se izoliraju iz "svježih" tumora. U kliničkim istraživanjima koristio se Hsp gp96¹².

5.1.1.3. CJEPIVA NA BAZI PEPTIDE

Ova cjepiva se baziraju na peptidima koji se nalaze na površini tumorske stanice. Identificiraju se specifične molekule sa površine tumorske stanice koje prepoznaju limfociti T¹⁴. Mnogi antigeni na površini tumorske stanice izazivaju imunski odgovor i bez pojave autoimunosti. Pronalaze se takvi antigeni te se umnaža kratka aminokiselinska sekvenca koja kodira za antigenski dio (dio koji se prepoznaje). Glavni problem kod ove vrste cjepiva je identifikacija tih antigena. No, u novije vrijeme uspješno su dobivena mnoga cjepiva protiv tumorskih stanica. Cjepiva na bazi peptide primjenjuju se u liječenju raka dojke i u nekim vrstama melanoma¹⁵.

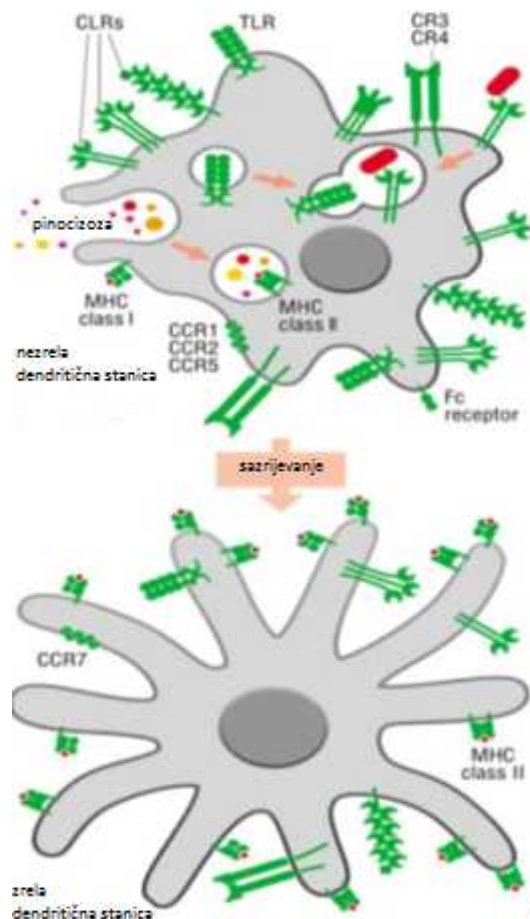
5.1.1.4. CJEPIVA NA BAZI DENDRITIH STANICA

Vrsta cjepiva koja sadrži ljudske dendritičke stanice. Dendritičke stanice su antigen prezentirajuće stanice sa svojstvom unošenja i procesiranja antigena u tkivima i perifernoj krvi¹³. Dokazano je da *in vivo* tumorske stanice oslobađaju određene faktore koje dovode do inhibicije proliferacije i migracije dendritičkih stanica. Glavni problem je što dendritičke stanice nema dovoljno u optjecaju, što kombinirano sa inhibitorima izluka od strane tumorskih stanica dovodi do stvaranja “rupe” u imunološkom sustavu. Dendritičke stanice se izoliraju iz pacijenta i kultiviraju se *in vitro* prilikom čega se zahvaljujući i mogu nastati endocitoze, „punjenje“ antigenima, DNA ili RNA³. Kultiviranje *in vitro* omogućilo je otkriće da se mijeloidne dendritičke stanice mogu lako proizvesti koristeći monocite ili CD34⁺ prekursore¹³.



Slika 10: „Punjenje dendritičkih stanica“ (preuzeto iz: Pecorino, 2008³)

Tako pripremljene dendritičke stanice vraćaju se u organizam pacijenta gdje aktiviraju proizvodnju citotoksičnih limfocita T. Problem takvih cjepiva je izrazito visoka cijena. Rezultati liječenja terapeutskim cjepivima su jako dobri, sa zadovoljavajućim imunosnim bez značajnih nuspojava poput autoimunosti. U znanstvenim krugovima postavlja se pitanje da li postoji razlika između primjene zrelih i nezrelih dendritičkih stanica. Tijekom sazrijevanja dendritičke stanice razvijaju ogranke, dendrite. Dendritičke stanice u krvi se nalaze u nezrelom obliku, a stupanje u dodir s antigenom te upalni signali potiču njihovo sazrijevanje. Iako mehanizam djelovanja još nije u potpunosti jasan, postoje indikacije velikoj razlici između zrelih i nezrelih dendritičkih stanica. Stupanj zrelosti dendritičkih stanica mogao bi biti jako važan faktor u efikasnosti imunoterapije³.



Slika 11: Razlika između diferenciranih i nediferenciranih dendritičnih stanica (preuzeto iz Pecorino, 2008³)

PROVENGE

Jedan od primjera odobrenih cjepiva koje je sastavljeno od dendritičnih stanica je „Provenge“. Koristi se u terapiji za liječenje raka prostate. Za proizvodnju je potrebno prvo izolirati frakciju obogaćenu prekursorima dendritičnih stanica. Potom stanice sazrijevaju *in vitro* inkubacijom sa rekombinantnim fuzijskim proteinom (on se sastoji od kisele fosfataze iz prostate koja je povezana sa faktorom za stimulaciju granulocitnih-makrofagnih kolonija, GM-CSF) koji se veže na GM-CSF receptor na dendritičnim stanicama. Tako dobivene dendritičke stanice

sadrže vezan tumorski antigen te se vraćaju u organizam³. Provenge je odobren 29.04.2010., te se primjenjuje na pacijentima koji imaju poodmakli stadij raka prostate i kod kojih hormonska terapija nema utjecaja. Produljuje život za oko 4 mjeseca pacijentima u terminalnom stadiju¹⁶.

5.2. CJEPIVA ZA PREVENCIJU TUMORA

Neke vrste tumora uzrokovane su bakterijama ili virusima (patogeni karcinogeni). U takvim slučajevima moguće je sintetizirati cjepiva koja ne moraju biti usmjerena protiv samog tumora, nego protiv patogena koji uzrokuje tumor. Jedan od dobrih primjera je HPV (humani papilloma virus). Infekcija tim virusom može uzrokovati pojavu cervikalnog raka maternice³. Ta vrsta raka 100% je uzrokovana virusom i do sada nije nađen niti jedan uzročnik, osim virusnog, koji dovodi do nastanka tog tipa raka.

U 2007. odobreno je cjepivo za prevenciju infekcije HPV-om. Dva cjepiva koja su danas dostupna na tržištu su „Cervarix“ i „Gardsil“. Važno je pritom napomenuti da razvijena cjepiva ne štite od HPV-a u potpunosti, oni štite od nekih specija HPV-a (štite od virusa najvišeg rizika).¹⁷ Razvijaju se i cjepiva koja bi trebala spriječiti rak dojke. Ta cjepiva su trenutno u prvoj ili drugoj fazi kliničkih istraživanja, ali proći će još dosta vremena prije nego što takvo cjepivo bude komercijalno dostupno³.

5. ZAKLJUČAK:

Napredak u istraživanju tumora u posljednjih nekoliko desetljeća zaista je zadivljujući. Dobili smo uvid u jedan cijeli novi svijet. Razvijena su već neka cjepiva koja su odobrena i u uporabi su, a mnoga čekaju odobrenje. Jedan problem kod cjepiva protiv tumorskih stanica je njihova jako visoka cijena. Također, jako je važno u kojem će smjeru dalje ići razvoj cjepiva; da li će se razvoj i istraživanje više fokusirati na terapijska ili na preventivna cjepiva. Nastoje se razviti što bolje metode za efikasnu izolaciju tumorskih antigena. Veliki problem kod primjene cjepiva, tj. kod tumora općenito, je činjenica da je tumor brzo adaptiran na sustav. To je vrlo velik problem te se na njegovom rješavanju još uvijek radi. Upravo zbog svoje kompleksnosti upitno je da li će tumor ikada moći biti efikasno izliječen.

6. LITERATURA:

- 1 Alberts, B., Wilson, J. H. & Hunt, T. *Molecular biology of the cell*. 5th edn, (Garland Science, 2008).
- 2 Igor Andreis, D. B., Filip Čulo, Danka Grčević, Matko Marušić, Milan Taradi, Dora Višnjić. *Imunologija*. (2010).
- 3 Pecorino, L. *Molecular biology of cancer : mechanisms, targets, and therapeutics*. 2nd edn, (Oxford University Press, 2008).
- 4 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013 (2011).
- 5 Bianchi, G., Borgonovo, G., Pistoia, V. & Raffaghello, L. Immunosuppressive cells and tumour microenvironment: focus on mesenchymal stem cells and myeloid derived suppressor cells. *Histology and histopathology* **26**, 941-951 (2011).
- 7 de Souza, A. P. & Bonorino, C. Tumor immunosuppressive environment: effects on tumor-specific and nontumor antigen immune responses. *Expert review of anticancer therapy* **9**, 1317-1332, doi:10.1586/era.09.88 (2009).
- 8 Finn, O. J. Cancer vaccines: between the idea and the reality. *Nature reviews. Immunology* **3**, 630-641, doi:10.1038/nri1150 (2003).
- 10 Joseph, A. *et al*. Liposomal immunostimulatory DNA sequence (ISS-ODN): an efficient parenteral and mucosal adjuvant for influenza and hepatitis B vaccines. *Vaccine* **20**, 3342-3354 (2002).
- 11 Lollini, P. L., Cavallo, F., Nanni, P. & Forni, G. Vaccines for tumour prevention. *Nature reviews. Cancer* **6**, 204-216, doi:10.1038/nrc1815 (2006).
- 12 Antonia, S., Mule, J. J. & Weber, J. S. Current developments of immunotherapy in the clinic. *Current opinion in immunology* **16**, 130-136, doi:10.1016/j.coi.2004.01.012 (2004).
- 13 Figdor, C. G., de Vries, I. J., Lesterhuis, W. J. & Melief, C. J. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nature medicine* **10**, 475-480, doi:10.1038/nm1039 (2004).
- 14 Machiels, J. P., van Baren, N. & Marchand, M. Peptide-based cancer vaccines. *Seminars in oncology* **29**, 494-502 (2002).
- 15 Jackson, D. C., Purcell, A. W., Fitzmaurice, C. J., Zeng, W. & Hart, D. N. The central role played by peptides in the immune response and the design of peptide-based vaccines against infectious diseases and cancer. *Current drug targets* **3**, 175-196 (2002).

INTERNET:

<http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Therapy/cancer-vaccines>

<http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/CellularGeneTherapyProducts/ApprovedProducts/ucm210215.htm>

<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/learning-center/biofiles/biofiles-4-7/angiogenesis/tumor-microenvironment.html>

SAŽETAK:

Tumori su područje izrazitog interesa za znanstvenike. Zbog svoje kompleksnosti jako je teško naći i neko efektivno cjepivo. Novim pristupom tumorima znanstvenici su sve bliže rješenju. Fokus se premješta sa same tumorske stanice na mikrookoliš tumora te na njegovo djelovanje na okolne stanice; stanice organizma na koje tumor djeluje. Tijekom istraživanja koja obuhvaćaju tumore znanstvenici često nailaze na mnoge probleme. Možda najveći problem leži u tome što je tumor izrazito brzo adaptirajuć i te je zbog toga jako teško naći i efektivno i trajno rješenje protiv njega. No uspjesi su svakako zabilježeni razvojem novih terapijskih i u novije vrijeme preventivnih cjepiva. Ipak, moramo biti svjesni da i u najboljim uvjetima sa idealnim cjepivom uspjeh cjepiva ovisi o sposobnosti imunološkog sustava da prevlada imunosupresiju induciranu tumorom, samom terapijom ili starosti samog organizma.

Ovaj rad dao je kratak pregled općih svojstava tumora, njegovog mikrookoliša i djelovanja tumora na okolne stanice, te razvoja novih terapija za liječenje tumora.